

张硕,姜晓燕,沈水杰,等. 斑马鱼肝癌细胞与肿瘤相关成纤维细胞可视化转移模型的构建 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31 (3): 296-301.

Zhang S, Jiang XY, Shen SJ, et al. Establishment of a visual metastasis model of hepatoma cells and cancer-associated fibroblasts in zebrafish [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 296-301.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.03.003

斑马鱼肝癌细胞与肿瘤相关成纤维细胞可视化转移模型的构建

张硕¹,姜晓燕^{1*},沈水杰²,吴育²,蔡艳¹,葛炜炜¹,李高盼³

(1. 南通市中医院药剂科,江苏 南通 226001;2. 南通市中医院科教科,江苏 南通 226001;3. 环特生物科技公司,杭州 310051)

【摘要】 目的 利用斑马鱼构建肝癌细胞与肿瘤相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)可视化转移模型,为 CAFs 介导的肿瘤转移患者的机制研究和药效评价提供临床前模型。**方法** 建立肝癌 Huh7 细胞与 CAFs 体外共培养体系,分别采用 CCK8 和 Transwell 小室检测 Huh7 细胞的增殖和迁移能力。同时将不同颜色荧光标记的 Huh7 细胞和 CAFs 注射到斑马鱼卵黄周隙中,构建可视化转移模型,观察 CAFs 对 Huh7 细胞迁移的影响以及 Huh7 细胞与 CAFs 在血管中的结合情况。**结果** 与 CAFs 共培养的 Huh7 细胞的增殖和迁移能力显著增加。此外,成功建立斑马鱼肝癌细胞和 CAFs 可视化转移模型。与 CAFs 共注射的 Huh7 细胞的迁移能力和结合率显著增加。**结论** CAFs 促进肝癌细胞的迁移,并且在远端转移中,大多数肝癌细胞与 CAFs 仍处于紧密结合状态。因此在临床上可以靶向实体瘤的成纤维成分,阻断其对肿瘤的支持作用,为肿瘤治疗提供新策略。

【关键词】 肿瘤相关成纤维细胞;肝细胞肝癌;转移;斑马鱼;可视化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 03-0296-06

Establishment of a visual metastasis model of hepatoma cells and cancer-associated fibroblasts in zebrafish

ZHANG Shuo¹, JIANG Xiaoyan^{1*}, SHEN Shuijie², WU Yu², CAI Yan¹, GE Weiwei¹, LI Gaopan³

(1. Department of Pharmacy, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226001, China.
2. Department of Science and Education, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226001.
3. Hunter Biotech Company, Hangzhou 310051)

Corresponding author: JIANG Xiaoyan. E-mail: 2314652303@qq.com

【Abstract】 Objective A visual metastasis model of hepatoma cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) was established using zebrafish to provide a preclinical model for CAFs-mediated mechanism research and therapeutic efficacy evaluation of patients with tumor metastasis. **Methods** After establishing a co-culture system, the proliferation and migration of Huh7 cells were assessed by CCK8 and Transwell assays, respectively. Huh7 cells and CAFs labeled with different fluorescent dyes were injected into the perivitelline space of zebrafish to establish a visual metastasis model. The effects of CAFs on Huh7 cell migration and Huh7 cell binding to CAFs in blood vessels were observed. **Results** The proliferation and migration of Huh7 cells co-cultured with CAFs were increased significantly. A visual metastasis model of hepatoma cells and CAFs in zebrafish was established successfully. The migration and binding rate of Huh7 cells co-injected

【基金项目】国家自然科学基金(82104408),南通市药学会医院药学基金(ntyx2021)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (82104408), Hospital Pharmacy Fund of Nantong Pharmaceutical Association (ntyx2021).

【作者简介】张硕(1990—),女,主管中药师,博士,研究方向:中药抗肿瘤机制。Email:992113053@qq.com

【通信作者】姜晓燕(1973—),女,主任中药师,研究方向:中药学。Email:2314652303@qq.com

with CAFs were increased significantly. **Conclusions** CAFs promote migration of hepatoma cells, and most hepatoma cells are tightly bound to CAFs in distal metastases. Therefore, fibroblasts of solid tumors can be targeted to block their support of tumors and provide a new strategy for cancer therapy.

【**Keywords**】 cancer associated fibroblasts; hepatocellular carcinoma; metastasis; zebrafish; visualization

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

根据世界卫生组织国际癌症研究机构发布的数据,2020 年全球被新确诊为肝癌的人超过 90 万,肝癌死亡的人达到 83 万,可见肝癌的发病率和死亡率几乎相当^[1]。其中肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 占肝癌的 70% ~ 90%,具有起病隐匿、恶性程度高、预后差等发病特点。目前 HCC 的治疗主要包括肝切除、肝移植和射频消融,但是频繁的肝内或全身转移仍是患者复发的主要原因^[2]。肿瘤相关成纤维细胞 (cancer associated fibroblasts, CAFs) 作为肿瘤微环境中最丰富而活跃的间质细胞群,通过分泌多种生长因子强化 HCC 特征,包括侵袭能力、细胞外基质调控、血管新生及耐药性^[3]。更重要的是,CAFs 从原发部位动员、募集、劫持癌细胞进行扩散,并协助癌细胞定植到新的转移灶^[4-5]。可见,目前治疗的靶点已经单纯从肿瘤本身变为癌细胞和 CAFs 之间相互作用,因此构建肝癌细胞与 CAFs 可视化转移模型尤为重要。

癌细胞与 CAFs 的体外共培养,被广泛应用于肿瘤微环境中间质细胞对肿瘤转移的研究^[6-7]。近年来,斑马鱼模型研究癌细胞迁移和肿瘤微环境越来越有价值^[8-9]。利用斑马鱼建立肝癌细胞与 CAFs 可视化转移模型的主要优势:(1)斑马鱼幼胚缺乏高效的免疫系统,可以在体内迅速形成原发肿瘤^[10];(2)转基因斑马鱼的血管内皮细胞表达荧光蛋白,血管的形态在激光共聚焦成像系统下能够直观展示;(3)由于肝癌细胞与 CAFs 被不同颜色的荧光标记,肝癌细胞和 CAFs 之间的相互作用在单细胞水平上能够直接可视化。本研究建立肝癌 Huh7 细胞与 CAFs 体外共培养体系,同时构建 Huh7 细胞与 CAFs 可视化转移模型,为 CAFs 介导的肿瘤转移患者的机制研究和药效评价提供临床前模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

TG 品种的 *flkl-EGFP* 转基因斑马鱼,由环特生物科技公司提供【SCXK (浙) 2022-0003】。斑马鱼置于 28℃ 恒温的循环水中培养,电导率为 450 ~

550 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH = 6.5 ~ 8.5, 硬度为 50 ~ 100 mg/L CaCO_3 。房间温度为 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $(60 \pm 5)\%$, 给予 14 h 光照和 10 h 黑暗交替照明,饲养于环特生物养鱼中心【SYXK (浙) 2022-0004】。饲养及管理符合国际 AAALAC 认证的要求,所有操作均获得杭州环特生物科技公司伦理委员会批准 (IACUC 2022-3718-01)。

1.1.2 细胞株

人肝癌 Huh7 细胞、正常成纤维细胞 (normal fibroblasts, NFs)、CAFs 均由上海传秋生物科技公司提供。Huh7、NFs、CAFs 细胞用含 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基,37℃,5% CO_2 培养箱中培养。

1.1.3 主要试剂与仪器

DMEM 培养基、胎牛血清购自南京生航生物技术有限公司;抗 Vimentin 抗体购自美国 proteintech 公司;CCK8 试剂盒购自广州赛库生物技术有限公司;Transwell 小室购自广州洁特生物科技公司。酶标仪购自美国 Bio Tek 公司;光照培养箱型号为 GHP-400,购自上海将任实验设备公司;体视显微镜型号为 SZ51,激光共聚焦扫描显微镜型号为 FV3000,均购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞免疫荧光鉴定

取对数生长期的 CAFs 细胞,进行细胞爬片、固定,加入 50 μL 破膜封闭液。2 h 后吸出封闭液,加入 50 μL 抗 Vimentin 抗体 (1:100),4℃ 孵育过夜。第 2 天室温避光孵育二抗 (1:500) 2 h, PBS 浸洗 3 次。然后加入 DAPI 染色 5 min, PBS 浸洗 3 次。滴加 Fluoromount-G 封片,利用荧光显微镜观察并采集图像。

1.2.2 实验分组及建立肝癌 Huh7 细胞与 CAFs 共培养体系

分为 Huh7 细胞单独培养组 (Huh7 组)、Huh7 细胞与 NFs 共培养组 (NFs 组)、Huh7 细胞与 CAFs 共培养组 (CAFs 组)。使用 Transwell 系统 (0.4 μm 孔径) 建立共培养体系,上层接种 CAFs,下层接种 Huh7 细胞。

1.2.3 CCK8 法检测细胞增殖能力

取对数生长期的 Huh7 细胞,将每孔含 1.2×10^4 个 Huh7 细胞的细胞悬液接种于 Transwell 下室,每孔 600 μL 细胞悬液。取对数生长期的 CAFs,将每孔含 1.2×10^4 个 CAFs 的细胞悬液接种于 Transwell 上室,每孔 200 μL 细胞悬液。每组设置 5 个复孔,置于细胞培养箱中培养。分别于 12、24、48 h 取出培养板,每孔加入 20 μL 的 CCK8 试剂,待培养液显色后,用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光值。用细胞存活率代表细胞增殖能力,计算公式为:细胞存活率=(处理组吸光值-空白组吸光值)/(对照组吸光值-空白组吸光值) $\times 100\%$ 。

1.2.4 Transwell 小室检测细胞迁移能力

取对数生长期的 Huh7 细胞,用无血清的 DMEM 培养基重悬细胞,将每孔含 2×10^4 个 Huh7 细胞的细胞悬液接种于 Transwell 上室,每孔 400 μL 细胞悬液。将每孔含 1×10^4 个 CAFs 的细胞悬液接种于 Transwell 下室,每孔 600 μL 细胞悬液,在细胞培养箱中培养 24 h。取出小室,吸出培养液,用棉签将未迁移的细胞轻轻擦掉,100% 甲醇溶液固定,随后用 0.1% 结晶紫染色 20 min,蒸馏水冲洗。倒置显微镜下随机选取 5 个视野计算迁移细胞数。

1.2.5 利用斑马鱼建立肝癌细胞与 CAFs 可视化转移模型

染色:制备细胞悬液,1 mL Huh7 细胞悬液加入 5 μL 的红色荧光染料 CM-DiI,1 mL CAFs 细胞悬液加入 1 μL 的远红外荧光探针 DiD。1000 r/min 离

心 3 min,PBS 清洗 3 次后用 DMEM 培养基重悬至 $2 \times 10^7/\text{mL}$ 。注射:将受精后 2 d 的 *flk1-EGFP* 转基因斑马鱼胚胎固定至低熔点琼脂板上。将已染色的 Huh7 细胞注射到胚胎的卵黄周隙中,每胚胎约 400 个细胞。随机分成 3 组:Huh7 组、NFs 组、CAFs 组。Huh7 组只注射 Huh7 细胞。CAFs 组先注射 Huh7 细胞,1 h 后再注射已染色的 CAFs 细胞,每胚胎约 400 个细胞。挑选完后将斑马鱼胚胎置于光照培养箱中培养。观察:注射 4 d 后采用激光共聚焦显微镜进行观察,统计尾部泄殖腔周围远端迁移的 Huh7 细胞数目,以及 Huh7 细胞与 CAFs(或 NFs)双染的细胞数目,计算 Huh7 细胞与 CAFs(或 NFs)的结合率,结合率 = Huh7 细胞与 CAFs(或 NFs)双染的细胞数目/远端迁移的 Huh7 细胞数目。

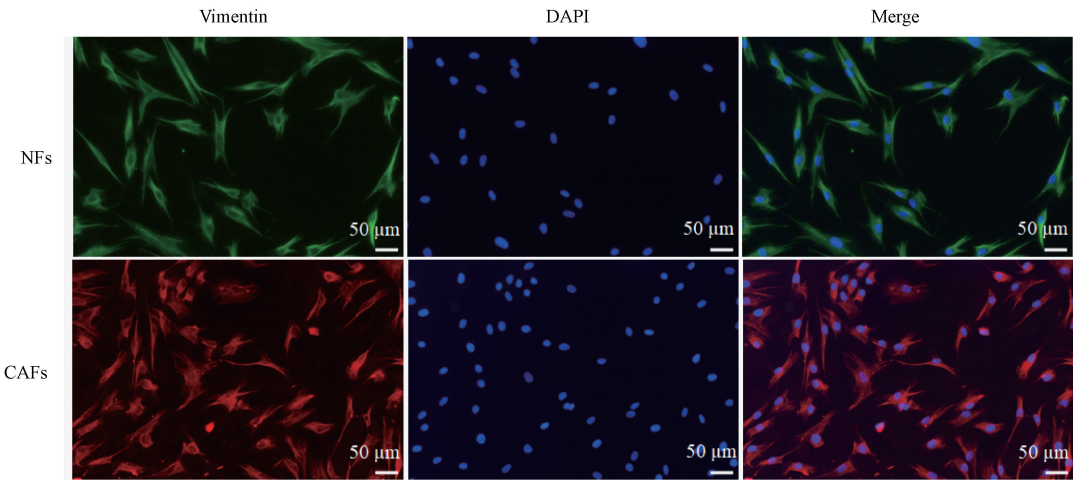
1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件分析数据。数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,方差齐性的组间两两比较采用 LSD 法,不满足方差分析条件的采用 *Kruskal-Wallis H* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光鉴定

对 NFs 和 CAFs 间质细胞标志物进行检测,结果显示 NFs 呈梭形或多角形,细胞规则;CAFs 形态不规则,细胞突起多于 NFs。Vimentin 在 CAFs 中的表达高于 NFs(图 1)。

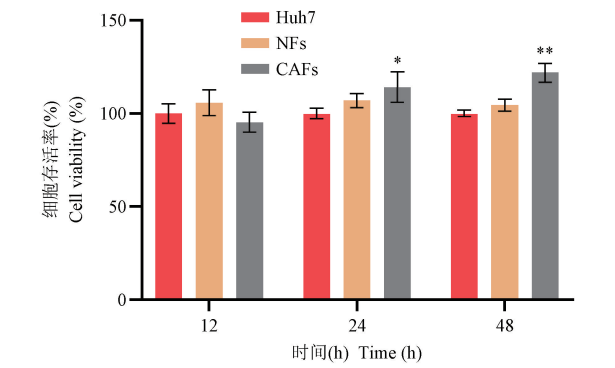


注:免疫荧光染色检测 Vimentin 蛋白分布情况。
图 1 CAFs 和 NFs 中 Vimentin 表达情况

Note. Distribution of Vimentin protein was detected by immunofluorescent staining.
Figure 1 Expressions of Vimentin in CAFs/NFs cells

2.2 CAFs 促进肝癌 Huh7 细胞的增殖

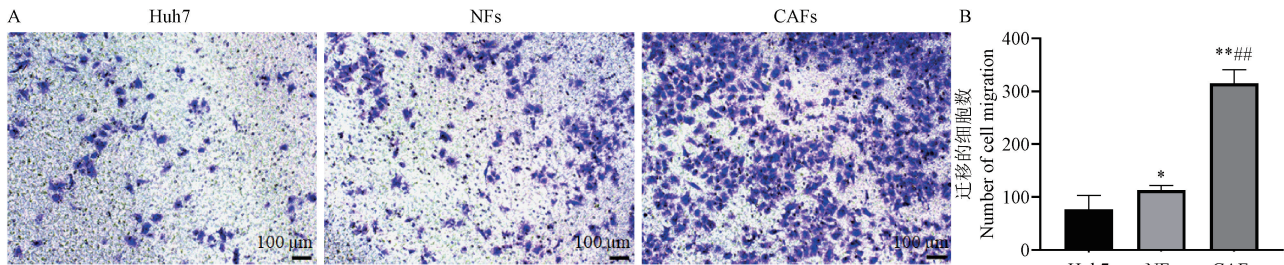
将 Huh7 细胞单独培养设为对照组,与 CAFs 建立共培养体系,培养 12、24、48 h 后检测细胞增殖情况。结果表明,培养 24 h 和 48 h 后,CAFs 组 Huh7 细胞的增殖能力显著高于 Huh7 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 Huh7 组相比,NFs 组 Huh7 细胞的增殖能力无显著性差异(图 2)。



注:与 Huh7 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
图 2 CAFs 对肝癌 Huh7 细胞增殖的影响
Note. Compared with group Huh7, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.
Figure 2 Effect of CAFs on the proliferation of Huh7 cells

2.3 CAFs 促进肝癌 Huh7 细胞的迁移

采用 Transwell 体系建立 CAFs 与 Huh7 细胞共培养模型,观察 CAFs 对 Huh7 细胞迁移能力的影响。



注:与 Huh7 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 NFs 组相比,*** $P < 0.01$ 。(下图同)
图 3 CAFs 对肝癌 Huh7 细胞迁移的影响
Note. Compared with group Huh7, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with group NFs, *** $P < 0.01$. (The same in the following figures)
Figure 3 Effect of CAFs on the migration of Huh7 cells

3 讨论

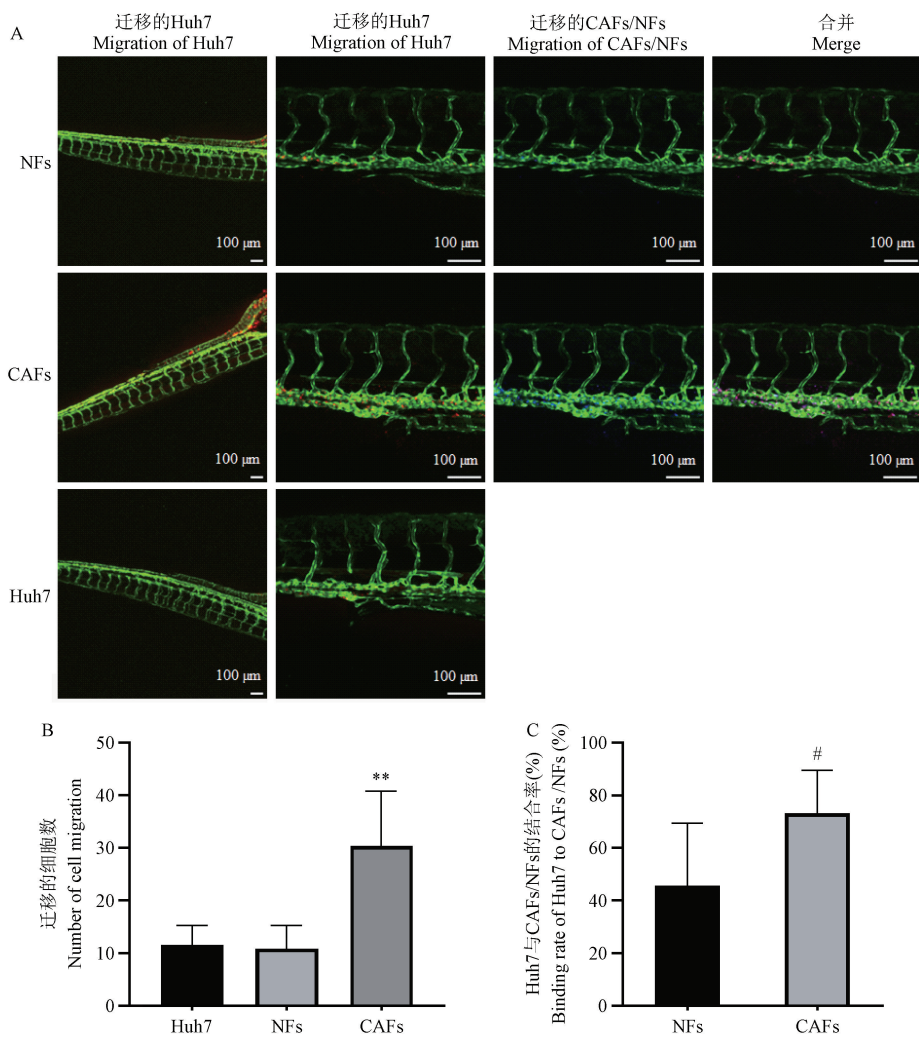
为了更好地模拟肿瘤生长微环境,开发癌细胞和 CAFs 相互作用的临床前模型迫在眉睫^[11]。本实验利用 *flk1-EGFP* 转基因斑马鱼的血管能够清晰成像,构建不同颜色荧光标记的肝癌细胞与 CAFs 可视化转移模型,对于研究肿瘤微环境中间质细胞对肝癌细胞转移的作用机制、寻找新的治疗靶点、评

估新型药物至关重要。结果显示,与 Huh7 组相比,NFs 组、CAFs 组 Huh7 细胞的迁移数目显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 NFs 组相比,CAFs 组 Huh7 细胞的迁移数目显著增加($P < 0.01$)(图 3)。

2.4 斑马鱼肝癌细胞与 CAFs 可视化转移模型的构建

将红色荧光染料 CM-DiI 标记的肝癌 Huh7 细胞和远红外荧光探针 DiD 标记的 CAFs 注射到斑马鱼胚胎中,构建斑马鱼肝癌细胞和 CAFs 可视化转移模型,激光共聚焦显微镜下观察肿瘤微环境中 CAFs 对 Huh7 细胞迁移的影响。其中红色细胞代表远端迁移的 Huh7 细胞,蓝色细胞代表远端迁移的 CAFs(或 NFs),紫色细胞代表 Huh7 与 CAFs(或 NFs)双染的细胞,即 Huh7 与 CAFs(或 NFs)在血管中结合的细胞。与 Huh7 组相比,NFs 组远端迁移的 Huh7 细胞数目无显著性差异,而 CAFs 组远端迁移的 Huh7 细胞数目显著增加($P < 0.01$)(图 4A, 4B)。大多数远端迁移的肝癌细胞能够与 CAFs 紧密结合,显示双染阳性。Huh7 细胞与 CAFs 的结合率高于与 NFs 的结合率($P < 0.05$)(图 4A, 4C)。结果表明 CAFs 促进肝癌 Huh7 细胞迁移,并且在远端转移过程中大多数肝癌细胞与 CAFs 仍处于紧密结合状态。

目前很多研究者将目光投入于 CAFs 介导的啮齿类动物转移性肿瘤模型中,即从新鲜的肿瘤标本中提取 CAFs,然后将癌细胞和 CAFs 按照一定的比例移植到小鼠体内,通过肿瘤体积、结缔组织增生、转移器官数量等组织病理学方法评价肿瘤的转移情况^[12-15]。与上述模型相比,本实验构建斑马鱼肝癌细胞与 CAFs 可视化转移模型的优势在于,肝癌



注:A:将肝癌 Huh7 细胞和 CAFs(或 NFs)注射到斑马鱼胚胎的卵黄周隙中,构建斑马鱼肝癌细胞和 CAFs 可视化转移模型,红色细胞代表远端迁移的 Huh7 细胞,蓝色细胞代表远端迁移的 CAFs(或 NFs),紫色细胞代表 Huh7 与 CAFs(或 NFs)双染的细胞;B:注射 4 d 后,对斑马鱼尾部泄殖腔周围远端迁移的 Huh7 细胞数目进行统计;C:对斑马鱼血管中 Huh7 细胞与 CAFs(或 NFs)的结合率进行统计;与 NFs 组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。

图 4 斑马鱼肝癌细胞与 CAFs 可视化转移模型的构建($n = 8$)

Note. A. Huh7 cells and CAFs/NFs were implanted into the perivitelline space of each zebrafish, which could construct the visual metastasis model of Huh7 cells and CAFs in zebrafish. Red cells represented distally migrating Huh7 cells. Blue cells represented distally migrating CAFs/NFs. Purple cells represented Huh7 cells co-stained with CAFs/NFs. B. 4 days after injection, the number of distally migrating Huh7 cells around the tail cloaca of zebrafish was counted and statistically analyzed. C. Binding rate of Huh7 to CAFs/NFs in zebrafish blood vessels was statistically analyzed. Compared with group NFs, $^{\#}P < 0.05$.

Figure 4 Construction of visual metastasis model of Huh7 cells and CAFs in zebrafish($n = 8$)

细胞与 CAFs 被荧光染料标记成不同的颜色,同时斑马鱼血管能够清晰成像,使得观察研究这两类细胞在血行转移和远端播散中的相互作用成为可能,实现了单细胞水平上的直接可视化,而这对于其他动物模型仍然具有很大的挑战性^[16]。虽然国外也有文献报道了通过癌细胞和 CAFs 共同注射到斑马鱼体内建立肿瘤转移模型,但是实验操作是先将癌细胞和 CAFs 混合于培养基中,再将混合液注射到

斑马鱼卵黄周隙中,可能因为两种细胞混合不均匀影响结果的准确性^[17]。因此本实验做了一定的改进,先注射癌细胞,1 h 后再注射已染色的 CAFs 细胞,采用这种分开注射的方法保证了结果的准确性。斑马鱼是研究肿瘤发病机制和转移的新型常用模型^[18]。本实验不仅建立肝癌 Huh7 细胞与 CAFs 体外共培养体系,同时利用斑马鱼构建 Huh7 细胞与 CAFs 可视化转移模型,分别从体外和体内

观察 CAFs 对 Huh7 细胞迁移的影响。体内外实验均证实了 CAFs 促进肝癌细胞的迁移。研究发现肿瘤间质细胞 CAFs 与癌细胞相互作用促进肿瘤发生发展,但两者细胞在血管中的结合情况报道较少^[19]。因此本实验还利用斑马鱼模型观察了 Huh7 细胞与 CAFs 在血管中的结合情况。结果发现在远端转移中,大多数肝癌细胞与 CAFs 仍处于紧密结合状态,这与文献报道符合,即 Huh7 细胞与 CAFs 的复合物是促进肿瘤转移的引擎,肿瘤“种子”和纤维化的“土壤”一起进入血液循环,甚至包括远端组织和器官。提示我们在临床上可以靶向实体瘤的成纤维成分,阻断其对肿瘤的支持作用。下一步实验将运用哺乳动物 NOD/Scid 严重免疫缺陷小鼠或 Balb/C 裸鼠皮下接种人荧光标记癌细胞株 Huh7,同时在癌细胞株周围给予荧光标记不同颜色的 CAFs,结合小动物成像动态观察体内肿瘤不同时间的生长情况,为临床肿瘤研究提供新途径。

参 考 文 献 (References)

- [1] Martínez-Chantar ML, Avila MA, Lu SC. Hepatocellular carcinoma: updates in pathogenesis, detection and treatment [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(10): 2729.
- [2] Jiang H, Cao HJ, Ma N, et al. Chromatin remodeling factor ARID2 suppresses hepatocellular carcinoma metastasis via DNMT1-Snail axis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(9): 4770–4780.
- [3] Jia W, Liang S, Cheng B, et al. The role of cancer-associated fibroblasts in hepatocellular carcinoma and the value of traditional Chinese medicine treatment [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 763519.
- [4] Liu C, Zhang Y, Lim S, et al. A zebrafish model discovers a novel mechanism of stromal fibroblast-mediated cancer metastasis [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(16): 4769–4779.
- [5] Hurtado P, Martínez-Pena I, Piñeiro R. Dangerous liaisons: circulating tumor cells (CTCs) and cancer-associated fibroblasts (CAFs) [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(10): 2861.
- [6] Awaji M, Futakuchi M, Heavican T, et al. Cancer-associated fibroblasts enhance survival and progression of the aggressive pancreatic tumor via FGF-2 and CXCL8 [J]. *Cancer Microenviron*, 2019, 12(1): 37–46.
- [7] Zhong B, Cheng B, Huang X, et al. Colorectal cancer-associated fibroblasts promote metastasis by up-regulating LRG1 through stromal IL-6/STAT3 signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 13(1): 16.
- [8] Loveless R, Shay C, Teng Y. Unveiling tumor microenvironment interactions using zebrafish models [J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7: 611847.
- [9] Sturtzel C, Hocking J, Kirchberger S, et al. Studying the tumor microenvironment in zebrafish [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1329: 69–92.
- [10] Paatero I, Alve S, Gramolelli S, et al. Zebrafish embryo xenograft and metastasis assay [J]. *Bio Protoc*, 2018, 8(18): e3027.
- [11] Liu J, Li P, Wang L, et al. Cancer-associated fibroblasts provide a stromal niche for liver cancer organoids that confers trophic effects and therapy resistance [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 11(2): 407–431.
- [12] Fernando-Macías E, Fernández-García MT, García-Pérez E, et al. A new aggressive xenograft model of human colon cancer using cancer-associated fibroblasts [J]. *Peer J*, 2020, 8: e9045.
- [13] Chen B, Sang Y, Song X, et al. Exosomal miR-500a-5p derived from cancer-associated fibroblasts promotes breast cancer cell proliferation and metastasis through targeting USP28 [J]. *Theranostics*, 2021, 11(8): 3932–3947.
- [14] Li YY, Tao YW, Gao S, et al. Cancer-associated fibroblasts contribute to oral cancer cells proliferation and metastasis via exosome-mediated paracrine miR-34a-5p [J]. *EBioMedicine*, 2018, 36: 209–220.
- [15] Jelinek D, Zhang ER, Ambrus A, et al. A mouse model to investigate the role of cancer-associated fibroblasts in tumor growth [J]. *J Vis Exp*, 2020, 166: 61883.
- [16] Sun DY, Wu JQ, He ZH, et al. Cancer-associated fibroblast regulate proliferation and migration of prostate cancer cells through TGF- β signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 235: 116791.
- [17] Ren J, Smid M, Iaria J, et al. Cancer-associated fibroblast-derived Gremlin 1 promotes breast cancer progression [J]. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1): 109.
- [18] 刘诗成, 张瑞, 唐景峰, 等. 斑马鱼黑色素瘤模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(3): 416–422.
- [19] Liu SC, Zhang R, Tang JF, et al. Research progress in zebrafish melanoma model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(3): 416–422.
- [19] 李维莎, 刘宏飞, 严立波, 等. OGR1 与肿瘤微环境 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(7): 96–101.
- [19] Li WS, Liu HF, Yan LB, et al. OGR1 and the tumor microenvironment [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(7): 96–101.

[收稿日期] 2022-11-24